

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2022-0120454
(43) 공개일자 2022년08월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/12 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 1/12 (2019.02)

(21) 출원번호 10-2022-0008057

(22) 출원일자 2022년01월19일

심사청구일자 2022년01월19일

(30) 우선권주장

1020210024087 2021년02월23일 대한민국(KR)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

심상준

서울특별시 영등포구 의사당대로 127, 102동 1401호

전재민

서울특별시 동작구 사당로2자길 2-2

홍민희

경기도 성남시 수정구 위례동일로 24, 5905동 102호

(74) 대리인

정은열, 김태훈

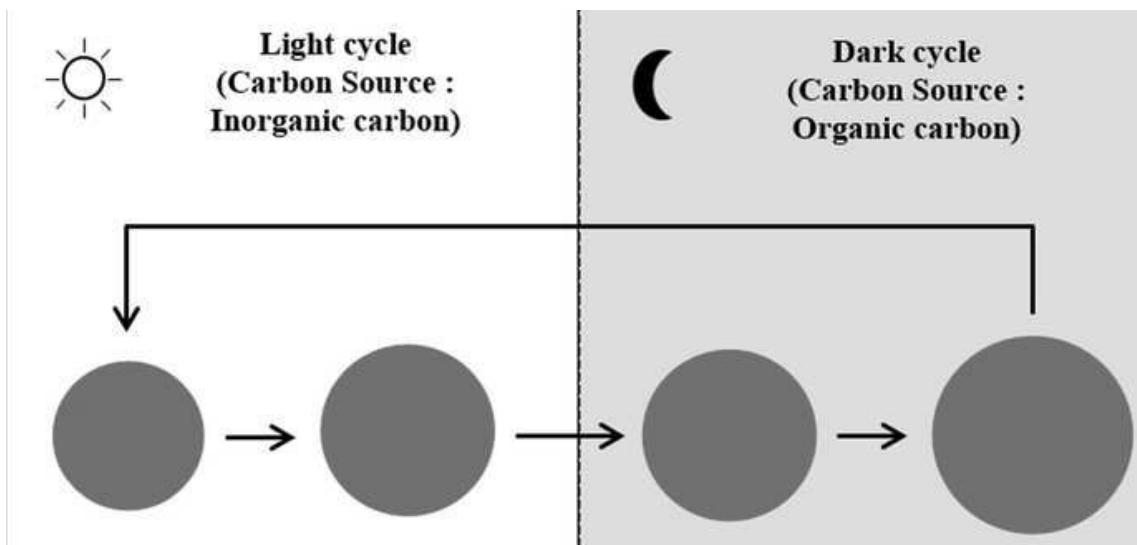
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 미세조류 배양방법

(57) 요약

본 발명은 미세조류 배양방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 미세조류 배양방법은 빛이 공급되는 소정의 제1 시간 동안, 독립영양방식으로 배지에서 미세조류를 배양하는 단계, 및 빛의 공급이 중단된 소정의 제2 시간 동안, 배지에 유기탄소원을 공급하여 종속영양방식으로 미세조류를 배양하는 단계를 포함한다.

대표도 - 도1a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1415169492
과제번호	20172010202050
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국에너지기술평가원
연구사업명	에너지수요관리핵심기술개발(에특)(R&D)
연구과제명	배기가스내 이산화탄소 포집 및 탄소자원화 하이브리드 동시처리 공정 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한국지역난방공사 미래개발원
연구기간	2020.08.01 ~ 2021.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 빛이 공급되는 소정의 제1 시간 동안, 독립영양방식으로 배지에서 미세조류를 배양하는 단계; 및
- (b) 상기 빛의 공급이 중단된 소정의 제2 시간 동안, 상기 배지에 유기탄소원을 공급하여 종속영양방식으로 상기 미세조류를 배양하는 단계;를 포함하는 미세조류 배양방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 (a) 단계 및 상기 (b) 단계를 순차적으로 반복하는 미세조류 배양방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 (a) 단계 및 상기 (b) 단계는 24시간 동안 연속적으로 진행되고,

상기 제1 시간은 15 ~ 17시간인 미세조류 배양방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 (a) 단계에서, 무기탄소원이 공급되는 미세조류 배양방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 유기탄소원은,

아세트산(acetic acid), 포도당(glucose) 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 미세조류 배양방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 아세트산의 농도는 0.5 ~ 1.8g/L인 미세조류 배양방법.

청구항 7

청구항 5에 있어서,

상기 포도당의 농도는 0.15 ~ 0.7g/L인 미세조류 배양방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 미세조류는 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*)인 미세조류 배양방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 미세조류 배양방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 광합성이 가능한 시간에는 독립영양방식으로, 그렇지 못한 시간에는 종속영양방식으로, 그 배양 방식을 분리하여 연속 배양하는 미세조류 배양방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 이산화탄소의 저감 및 활용(CCU) 및 경제성 확보를 위하여, 미세조류 바이오 프로세스의 상업화가 중요하다. 미세조류 배양 방식 중 독립영양방식은 대기 중 0.04%의 낮은 농도로 존재하는 CO₂의 농도에 크게 의존한다. 고농도의 CO₂ 농도에서는 미세조류 생장에 필요한 물질전달이 원활하게 이루어지므로, 고농도의 CO₂ 공급이 가능하며 CO₂ 공급의 경제성을 만족할 수 있는, 발전소로부터 얻은 배가스가 미세조류의 대규모 배양에 이용되고 있다.

[0004] 미세조류 바이오 프로세스의 상업화를 위하여, 바이오매스의 생산성을 향상시키기 위한 전략과 연구가 지속적으로 이루어지고 있다. 기존의 독립영양방식 하에서는, 빛과 CO₂ 공급이 지속적으로 이루어지더라도 일정 광주기 이후에는 광합성 효율이 떨어지기 때문에, 바이오매스 생산성 증가에 한계가 존재한다. 이러한 단점을 보완하기 위해 제시된 혼합영양배양방식과 종속영양배양방식은 유기탄소원을 추가적으로 이용하여 바이오매스 생산성을 향상시키는데에 기여할 수 있다. 이 중 혼합영양방식은 독립영양방식과 종속영양방식이 한 배양과정 내에서 함께 일어나는 영양방식이다. 혼합영양방식은 광합성을 통해 무기탄소원을 탄소고정시켜 화학적 에너지로 이용하는 독립영양방식과, 유기탄소원을 호흡을 통해 세포활동에 필요한 에너지를 얻는 종속영양방식이 동시에 일어나므로, 각각의 배양방식에 비해 높은 바이오매스 생산성을 얻을 수 있게 된다. 하지만 이러한 혼합영양방식은, 하기 선행문헌의 비특허문헌에 개시된 바와 같이, 바이오매스 생산성은 크지만 고농도 유기탄소의 흡수 저해, 광합성 효율 감소로 인한 엽록소 손실, 그리고 유기탄소원의 공급 비용 문제와 같은 해결해야 할 주요 과제들이 있다.

선행기술문헌**비특허문헌**

[0006] (비특허문헌 0001) Abreu, A.P., Fernandes, B., Vicente, A.A., Teixeira, J., Dragone, G., 2012. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresour Technol* 118, 61-66.

(비특허문헌 0002) Kong, W., Yang, S., Wang, H., Huo, H., Guo, B., Liu, N., Zhang, A., Niu, S., 2020. Regulation of biomass, pigments, and lipid production by *Chlorella vulgaris* 31 through controlling trophic modes and carbon sources. *J. Appl. Phycol.* 32 (3), 1569-1579.

(비특허문헌 0003) Smith, R.T., Bangert, K., Wilkinson, S.J., Gilmour, D.J., 2015. Synergistic carbon metabolism in a fast growing mixotrophic freshwater microalgal species *Micractinium inermum*. *Biomass Bioenergy* 82, 73-86.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 상술한 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 일측면은 광주기에는 독립영양방식으로, 암주기에는 종속영양방식으로 배양 방식을 주기별로 분리시켜 미세조류를 배양하는 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명에 따른 미세조류 배양방법은 (a) 빛이 공급되는 소정의 제1 시간 동안, 독립영양방식으로 배지에서 미세조류를 배양하는 단계; 및 (b) 상기 빛의 공급이 중단된 소정의 제2 시간 동안, 상기 배지에 유기탄소원을 공급하여 종속영양방식으로 상기 미세조류를 배양하는 단계;를 포함한다.
- [0010] 또한, 본 발명에 따른 미세조류 배양방법에 있어서, 상기 (a) 단계 및 상기 (b) 단계를 순차적으로 반복할 수 있다.
- [0011] 또한, 본 발명에 따른 미세조류 배양방법에 있어서, 상기 (a) 단계 및 상기 (b) 단계는 24시간 동안 연속적으로 진행되고, 상기 제1 시간은 15 ~ 17시간일 수 있다.
- [0012] 또한, 본 발명에 따른 미세조류 배양방법에 있어서, 상기 (a) 단계에서, 무기탄소원이 공급될 수 있다.
- [0013] 또한, 본 발명에 따른 미세조류 배양방법에 있어서, 상기 유기탄소원은, 세트산(acetic acid), 포도당(glucose) 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0014] 또한, 본 발명에 따른 미세조류 배양방법에 있어서, 상기 아세트산의 농도는 0.5 ~ 1.8g/L일 수 있다.
- [0015] 또한, 본 발명에 따른 미세조류 배양방법에 있어서, 상기 포도당의 농도는 0.15 ~ 0.7g/L일 수 있다.
- [0016] 또한, 본 발명에 따른 미세조류 배양방법에 있어서, 상기 미세조류는 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*)일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 특징 및 이점들은 첨부도면에 의거한 다음의 상세한 설명으로 더욱 명백해질 것이다.
- [0019] 이에 앞서 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이고 사전적인 의미로 해석되어서는 아니되며, 발명자가 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명에 따르면, 대규모 배양에서 광주기(Light cycle)에서는 독립영양배양방식, 암주기(Dark cycle)에서는 종속영양배양방식을 이용하여 세포생장성을 극대화할 수 있다. 기존의 독립영양배양방식과 비교하여 광합성 수용 시스템(Photosynthetic receptor system)에 부하를 주지 않고 보다 높은 바이오매스 수율을 얻을 수 있으며, 혼합영양배양 방식의 장점인 바이오매스 생산성을 기존의 통상적인 혼합영양배양 방식에 비해 향상시킬 수 있고, 혼합영양배양 과정에서 유기 탄소원 공급에 의한 광합성 저해와 유기탄소의 전환 효율 저해를 개선할 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명은 종속배양방식 기간 동안에 유기탄소원의 농도가 낮게 유지되므로, 박테리아 등에 의한 오염을 막기 위한 항생제 등 추가적인 화학물질을 첨가할 필요가 없으므로, 바이오매스 회수 시에 추가적인 화학물질을 제거하는 공정이 요구되지 않아 경제적이며, 암주기에 유기탄소원으로 아세트산, 포도당을 이용함으로써, 여러 종류의 폐수를 이용하여 탄소원을 더 공급해줄 수 있기 때문에 추가적인 경제성 확보를 기대할 수가 있다.

도면의 간단한 설명

[0024]

도 1a는 본 발명에 따른 순차적 반복 독립-종속영양 방식(Repeated sequential auto-and heterotrophic culture mode, RSAH)을 이용한 미세조류 배양방법의 모식도이다.

도 1b는 본 발명에 따른 순차적 반복 독립-종속영양 방식(RSAH)의 세포 성장 추이를 기존 독립영양방식(Autotrophy) 및 혼합영양방식(Mixotrophy)과 비교한 그래프이다.

도 2a 내지 도 2f는 실시예 1에 따른 유기탄소원으로 아세트산을, 무기탄소원으로 5% CO₂를 공급한 경우의 독립영양방식, 종속영양방식 및 혼합영양방식 각각에 대한 실험결과로서, 도 2a는 성장곡선, 도 2b는 24시간 간격으로 측정된 비성장속도, 도 2c는 유기탄소원 소모량 대비 바이오매스 생산량, 도 2d는 24시간 간격으로 측정된 ATP/ADP 비율, 도 2e는 48시간 지점에서 측정된 탄산무수화효소 비활성도, 도 2f는 48시간 지점에서 측정된 루비스코 효소 비활성도이다.

도 3a는 실시예 2에 따른 독립영양배양방식과 유기탄소원으로 아세트산을 사용한 경우(0.5g/L, 1g/L, 2g/L)의 혼합영양배양방식의 각 배양 방식별 건조 균체량 변화를 나타낸다.

도 3b는 실시예 2에 따른 독립영양배양방식과 유기탄소원으로 아세트산을 사용한 경우(0.5g/L, 1g/L, 2g/L)의 혼합영양배양방식의 각 배양 방식별 TCA 회로 내 중간생성물의농도(단위: $n \text{ mol } (10^7 \text{ cells})^{-1}$)를 나타낸다.

도 4a는 실시예 3에 따른 독립영양배양방식과 유기탄소원으로 포도당을 사용한 경우(0.5g/L, 1g/L, 2g/L)의 혼합영양배양방식의 각 배양 방식별 건조 균체량 변화를 나타낸다.

도 4b는 실시예 3에 따른 독립영양배양방식과 유기탄소원으로 포도당을 사용한 경우(0.5g/L, 1g/L, 2g/L)의 혼합영양배양방식의 각 배양 방식별 TCA 회로 내 중간생성물의농도(단위: $n \text{ mol } (10^7 \text{ cells})^{-1}$)를 나타낸다.

도 5a는 실시예 4에 따른 클로렐라 프로토테코이드의 광주기/암주기(24시간/0시간, 16시간/8시간, 14시간/10시간, 12시간/12시간)별 건조 중량을 나타낸다.

도 5b는 실시예 4에 따른 순차적 반복 독립-종속영양배양방식에서 유기탄소원으로 아세트산을 사용한 경우(0.5g/L, 1g/L, 2g/L)의 건조 균체량 변화를 나타낸다.

도 5c는 실시예 4에 따른 순차적 반복 독립-종속영양배양방식에서 유기탄소원으로 포도당을 사용한 경우(0.167g/L, 0.333g/L, 0.667g/L)의 건조 균체량 변화를 나타낸다(도면 하단에 표시된 구간은 0~16, 24~40, 48~64, 72~88, 96~112시간의 광주기 및 16~24, 40~48, 64~72, 88~96, 112~120시간의 암주기임).

도 6a는 실시예 5에 따른 유기탄소원으로 아세트산을 사용한 경우의 독립영양방식(Autotrophy), 혼합영양방식(Mixotrophy), 순차적 반복 독립-종속영양배양방식(Repeated sequential auto-and heterotrophy)에서의 건조 균체량 변화를 나타낸다.

도 6b는 실시예 5에 따른 유기탄소원으로 포도당을 사용한 경우의 독립영양방식(Autotrophy), 혼합영양방식(Mixotrophy), 순차적 반복 독립-종속영양배양방식(Repeated sequential auto-and heterotrophy)에서의 건조 균체량 변화(도면 하단에 표시된 구간은 0~16, 24~40, 48~64, 72~88, 96~112시간의 광주기 및 16~24, 40~48, 64~72, 88~96, 112~120시간의 암주기임)를 나타낸다.

도 6c는 실시예 5에 따른 유기탄소원으로 아세트산을 사용한 경우의 혼합영양방식(Mixotrophy), 순차적 반복 독립-종속영양배양방식(Repeated sequential auto-and heterotrophy)에서의 유기탄소원 소모량 대비 비성장속도의 값을 나타낸다.

도 6d는 실시예 5에 따른 유기탄소원으로 포도당을 사용한 경우의 혼합영양방식(Mixotrophy), 순차적 반복 독립-종속영양배양방식(Repeated sequential auto-and heterotrophy)에서의 유기탄소원 소모량 대비 비성장속도의 값을 나타낸다.

도 6e는 실시예 5에 따른 유기탄소원으로 아세트산을 사용한 경우의 독립영양방식(Autotrophy), 혼합영양방식(Mixotrophy), 순차적 반복 독립-종속영양배양방식(Repeated sequential auto-and heterotrophy)에서의 ATP/ADP 비를 나타낸다.

도 6f는 실시예 5에 따른 유기탄소원으로 포도당을 사용한 경우의 독립영양방식(Autotrophy), 혼합영양방식(Mixotrophy), 순차적 반복 독립-종속영양배양방식(Repeated sequential auto-and heterotrophy)에서의 ATP/ADP 비를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 본 발명의 목적, 특정한 장점들 및 신규한 특징들은 첨부된 도면들과 연관되어지는 이하의 상세한 설명과 바람직한 실시예들로부터 더욱 명백해질 것이다. 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다. 이하, 본 발명을 설명함에 있어서, 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 관련된 공지 기술에 대한 상세한 설명은 생략한다.
- [0027] 도 1a는 본 발명에 따른 순차적 반복 독립-종속영양 방식(Repeated sequential auto-and heterotrophic culture mode, RSAH)을 이용한 미세조류 배양방법의 모식도이고, 및 도 1b는 본 발명에 따른 순차적 반복 독립-종속영양 방식(RSAH)의 세포 성장 추이를 기존 독립영양방식(Autotrophy) 및 혼합영양방식(Mixotrophy)과 비교한 그래프이다.
- [0028] 도 1a에 도시된 바와 같이, 본 발명에 따른 미세조류 배양방법은 빛이 공급되는 소정의 제1 시간 동안, 독립영양방식으로 배지에서 미세조류를 배양하는 단계, 및 빛의 공급이 중단된 소정의 제2 시간 동안, 배지에 유기탄소원을 공급하여 종속영양방식으로 미세조류를 배양하는 단계를 포함한다.
- [0030] 미세조류 배양에 사용되는 종래 배양방식으로는 독립영양방식(Autotrophy), 종속영양방식(Heterotrophy), 혼합영양방식(Mixotrophy)이 있다. 본 발명은 독립영양방식 및 종속영양방식을 순차적으로 이용하는 넓은 의미의 혼합영양방식을 제안한다.
- [0031] 여기서, 독립영양방식의 배양 및 종속영양방식의 배양은 연속적으로 진행될 수 있다. 즉, 빛이 공급되는 동안(상기 제1 시간 동안)에는 독립영양방식으로, 빛 공급이 중단되는 동안(상기 제1 시간 종료 후 상기 제2 시간 동안)에는 종속영양방식으로 미세조류를 배양할 수 있다.
- [0032] 본 발명에 따른 독립영양방식과 종속영양방식은 24시간 동안 연속적으로 진행될 수 있다. 이때, 독립영양방식이 진행되는 상기 제1 시간은 15 ~ 17시간이고, 종속영양방식이 진행되는 상기 제2 시간은 7 ~ 9시간일 수 있다. 예를 들면, 광합성이 가능한 주간에는 독립영양방식으로, 그렇지 못한 야간에는 종속영양방식으로 미세조류를 배양할 수 있다.
- [0033] 또한, 본 발명에 따른 독립영양방식과 종속영양방식은 순차적으로 반복될 수 있다. 즉, 빛 공급이 가능한 상기 제1 시간 동안을 광주기(Light cycle)로, 빛 공급이 차단되는 상기 제2 시간 동안을 암주기(Dark cycle)로, 광주기와 암주기가 순차적으로 반복되는 동안에 광주기에는 독립영양방식으로, 암주기에는 종속영양방식으로 미세조류를 배양할 수 있다. 여기서, 광주기 및 음주기는 일(Day) 기준으로 주간 및 야간으로 구분되어, 미세조류의 옥외배양(Outdoor culture)에 본 발명이 적용될 수 있다. 다만, 본 발명이 반드시 옥외배양에만 한정되어 적용되어야 하는 것은 아니고, 인위적으로 빛을 공급하여 광주기를 조성하고, 빛 공급을 중단하여 암주기를 조성하여 본 발명을 적용할 수도 있다. 한편, 광주기/암주기는 16시간/8시간이 바람직하다.
- [0035] 혼합영양배양은 독립영양배양과 종속영양배양에 비해 바이오매스 생산성이 우수하지만, 그 바이오매스 생산성이 항상 독립영양배양과 종속영양배양의 합과 동일하지는 않다. 성장 조건에 따라 혼합영양배양 과정 내에서 독립영양배양과 종속영양배양이 상호작용하여 각 과정의 성장이 저해된다. 대표적으로, 유기탄소원의 추가는 미세조류의 호흡 과정에 영향을 미치며, 무기탄소원에 비해 에너지원으로 전환이 쉬우므로 유기탄소원의 농도가 높아지면 광합성의 효율이 저하된다. 또한, 유기탄소원의 존재는 TCA 회로의 활성을 변화시켜 광합성 효율을 저하시킨다. 종속영양배양에 이용되는 유기탄소원으로 아세트산염(아세트산, 아세트산 나트륨)을 주로 사용하는데, 아세트산염의 경우 동화 과정에서 숙신산 생산을 촉진하므로, 높은 농도의 아세트산염이 투입되게 되면 세포 성장이 저해된다. 또한, 유기탄소원의 공급은 배가스 공급을 이용한 CO₂ 공급 방식에 비하여 탄소원 공급에 필요한 추가적인 비용이 소모되는 문제가 있다. 또한, 독립영양배양과정에 있어서 지속적인 빛의 조사(16시간 이상)는 광합성 수용 시스템(Photosynthetic receptor system)에 손상을 일으키므로, 광합성 효율이 감소하게 되고, 세포 성장성 또한 제한된다.

- [0036] 이러한 종래 혼합영양배양 방식의 문제점들을 극복하기 위하여, 본 발명에서는 독립영양방식과 종속영양배양 방식을 주기별로 분리시켜서, 각각의 배양방식의 효율을 극대화시킴과 동시에, 각 종속영양배양 주기별로 유기탄소원을 저농도로 첨가하여 세포생장을 극대화할 수 있는 주기적 독립-종속배양 방식을 설계하였다.
- [0037] 본 발명에 따른 종속영양방식 배양 과정에서 공급되는 유기탄소원은 아세트산(acetic acid), 포도당(glucose) 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 여기서, 아세트산의 농도는 0.5 ~ 1.8g/L일 수 있는데, 0.8 ~ 1.2g/L이 적합하고, 보다 바람직하게는 1g/L일 수 있다. 한편, 포도당의 농도는 0.15 ~ 0.7g/L일 수 있는데, 0.5 ~ 0.7g/L이 적합하고, 보다 바람직하게는 0.667g/L일 수 있다. 광주기에서 완전한 독립영양방식을 유지하기 위해서, 암주기 동안에 모든 유기탄소원이 소모될 수 있되, 세포성장성을 방해하지 않는 한에서 유기탄소원을 최대한 첨가할 수 있도록 유기탄소원의 농도를 설정한 것이다.
- [0038] 본 발명에 따른 독립영양방식의 경우에는 배지를 TAP-C 배지를 이용할 수 있고, 종속영양방식의 경우에는 TAP-C 배지에 포도당이나 아세트산을 유기탄소원으로 이용할 수 있다.
- [0039] 본 발명에 따른 독립영양방식 배양 과정에서는 무기탄소원이 공급될 수 있는데, 그 무기탄소원은 CO₂일 수 있다.
- [0040] 본 발명은 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*)를 배양하는 방법으로 사용될 수 있으나, 그 대상 미세조류가 특별히 한정되는 것은 아니다.
- [0042] 본 발명에 따라 배양 과정에서 독립영양방식과 종속영양방식을 분리하였을 경우, 일반적으로 광합성이 일어나지 않는 암주기 구간에서는 종속영양방식만 일어나므로 광합성 수용시스템의 손상이 없이 바이오매스 생산성의 증대를 기대할 수 있으며, 혼합영양방식에서 유기탄소원에 의해 발생하는 광합성률의 감소와 성장 저해 효과를 막아줄 수 있는 장점이 존재한다.
- [0043] 도 1b에 도시된 바와 같이, 본 발명에 따른 순차적 반복 독립-종속영양 방식(Repeated sequential auto-and heterotrophic culture mode, RSAH)의 경우, 암주기에서도 세포생장이 원활하게 이루어지므로, 기존의 독립영양 방식 및 혼합영양방식에 비해 높은 바이오매스 생산성을 기대할 수 있다.
- [0045] 종합적으로, 본 발명은 순차적 반복 독립-종속영양 방식을 이용하여, 빛이 공급되는 주기에서는 독립영양방식의 환경을 적용하고, 빛이 공급되지 않는 주기에서는 유기탄소원을 공급하되, 세포생장이 억제되지 않도록 낮은 농도를 유지시켜주는 종속영양방식의 환경을 적용한다. 이를 통해 일반적인 혼합배양방식과 비교하여 바이오매스 생산성의 증가 뿐만 아니라, 광합성을 저해시키지 않음으로써 탄소고정비율(Carbon fixation rate)을 독립영양 방식에 준하게 유지시키며 이산화탄소 저장 효율을 보존할 수 있다. 또한, 본 특허를 통한 배양 방식은 종속배양방식 하에서 낮은 유기탄소원의 농도 유지를 통하여 유기탄소원의 바이오매스로의 전환 효율을 높게 유지시켜 줄 수 있다. 나아가 높은 농도의 유기탄소원을 공급해줄 필요가 없으므로, 폐수를 이용하여 보다 저렴한 비용의 유기탄소원의 공급을 통한 경제성 확보를 이룰 수 있다.
- [0047] 이하에서는 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0049] 실시예 1. 독립영양방식, 종속영양방식, 혼합영양방식이 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*)의 세포생장에 미치는 영향
- [0050] 각 배양방식(독립영양방식, 종속영양방식, 혼합영양방식)이 클로렐라 프로토테코이드(*Chlorella protothecoides*)의 세포 성장 및 물질 대사에 미치는 영향을 파악하기 위해 실험을 진행하였다. 이를 위해, 본 실험에서는 유기탄소원을 아세트산으로, CO₂를 무기탄소원으로 사용하였고, 독립영양방식에서는 탄소원을 무기탄소원으로, 종속영양방식에서는 탄소원을 유기탄소원으로, 혼합영양방식에서는 탄소원을 유기탄소원과 무기탄소원으로 동시에 사용하여 클로렐라 프로토테코이드를 배양하였다. 또한, 다른 물리-화학적 변수에 해당하는 온도, pH, 배양시간, 접종량 등은 동등하게 유지하였다.
- [0051] 도 2a 내지 도 2f는 실시예 1에 따른 유기탄소원으로 아세트산을, 무기탄소원으로 5% CO₂를 공급한 경우의 독립영양방식, 종속영양방식 및 혼합영양방식 각각에 대한 실험결과로서, 도 2a는 성장곡선, 도 2b는 24시간 간격으

로 측정한 비성장속도, 도 2c는 유기탄소원 소모량 대비 바이오매스 생산량, 도 2d는 24시간 간격으로 측정한 ATP/ADP 비율, 도 2e는 48시간 지점에서 측정한 탄산무수화효소 비활성도, 도 2f는 48시간 지점에서 측정한 루비스코 효소 비활성도이다.

[0053] 위의 배양조건에서 120시간 동안 실험한 결과, 성장이 활발한 시점(72시간)에서 혼합영양배양방식으로 얻은 바이오매스량이 독립영양방식 및 종속영양방식으로 얻은 바이오매스량보다는 많지만, 독립영양방식 및 종속영양방식으로 얻은 바이오매스의 합보다는 적다는 결과를 얻을 수 있었다(도 2a 참조).

[0054] 비성장속도(μ)의 경우 또한 성장이 활발한 48 ~ 72시간 구간에서, 혼합영양배양방식의 비성장속도가 독립영양방식 및 종속영양방식으로 얻은 비성장속도보다 그 값이 크지만, 독립영양방식 및 종속영양방식으로 얻은 바이오매스의 합보다는 적다는 결과를 얻을 수 있었다(도 2b 참조).

[0055] 뿐만 아니라, 유기탄소원 소모 대비 바이오매스 성장비($Y_{A/B}$)는 종속영양방식이 혼합영양방식에 비해 그 값이 높음을 확인할 수 있었다(도 2c 참조). 다시 말해, 같은 양의 유기탄소원을 소모하였을 때, 혼합영양방식에 비해 종속영양방식이 유기탄소원을 바이오매스로 전환하는 비율이 높다는 뜻이다. 이에 대한 원인을 파악하기 위해, 24시간 간격으로 각 배양환경에서의 ATP/ADP 비율을 측정하였다. ATP/ADP 비율은 TCA 회로가 얼마나 활성화되어 있는지 확인할 수 있는 지표로, ATP/ADP 비율이 높을수록 TCA 회로의 활성도가 높다고 할 수 있다. 측정 결과, 종속영양방식의 ATP/ADP 비율이 혼합영양방식의 ATP/ADP 비율보다 높게 나타났다(도 2d 참조). 이를 도 2c와 함께 고려할 때, 종속영양방식의 경우 유기탄소원이 TCA 회로에서 효율적으로 사용되어 유기탄소원이 바이오매스로 전환되는 비율이 혼합영양방식에 비해 높음을 확인할 수 있었다. 한편, 유기탄소원은 미세조류가 광합성 과정 없이 이용할 수 있기 때문에, 무기탄소원과 유기탄소원이 공존하는 상태에서는 유기탄소원을 이용하는 것을 더 선호한다. 즉, 무기탄소원과 유기탄소원이 같이 있는 조건에서는 미세조류의 광합성량이 감소하게 되고, 이는 무기탄소원으로부터의 탄소 고정(carbon fixation)량의 감소를 가져오게 된다. 탄산무수화효소(Carbonic anhydrase, CA)와 루비스코(Rubisco)는 이산화탄소 집중 메카니즘(CCM)에 핵심적인 두 효소로, 두 효소의 활성화에 따라서 탄소고정의 활성화도를 측정할 수 있다. TCA 회로가 가장 활성화된 48시간 구간에서, 각 배양 방식(독립영양방식, 종속영양방식, 혼합영양방식)에 따른 탄산무수화효소 활성화도(도 2e 참조)와 루비스코의 활성화도(도 2f 참조)를 측정하였다. 탄산무수화효소의 경우 독립영양방식이 종속영양방식과 혼합영양방식에 비해 효소 활성화도가 2.67배 정도 높았으며, 종속영양방식과 혼합영양방식은 그 값이 비슷함을 확인하였다. 루비스코 활성화도도 이와 마찬가지로 독립영양방식이 종속영양방식과 혼합영양방식에 비해 3.5배 정도 높았으며, 종속영양방식과 혼합영양방식은 비슷한 값을 나타냈다. 이는 혼합영양방식에서 이산화탄소 집중 메카니즘을 통한 무기탄소원의 탄소 고정효율이 독립영양방식에 비해 떨어지며, 이산화탄소 집중 메카니즘과 효율적인 유기탄소원의 바이오매스의 전환을 고려하였을 때, 같은 양의 탄소원이 있다면 혼합영양방식보다 독립영양방식과 종속영양방식을 분리시킨 방식이 더 효율적인 배양 방식이라고 할 수 있다.

[0057] 실시예 2. 유기탄소원인 아세트산을 이용한 혼합영양배양 방식과 무기탄소원을 이용한 독립영양배양 방식의 바이오매스 및 TCA 회로 중간 생성물 비교

[0058] 유기탄소원으로 아세트산을 사용하였을 때, 유기탄소원의 공급에 따른 혼합영양배양 방식의 바이오매스와 TCA 회로 중간 생성물을 독립영양배양방식과 비교하였다. 광합성을 위하여 성장 기간 내에 혼합영양배양 방식과 독립영양배양방식에서는 지속적으로 빛을 공급하였다. 또한, 본 실험에서는 CO₂를 무기탄소원으로, 유기탄소원으로 아세트산을 사용하였고, 그 농도를 각각 0.5g/L, 1g/L, 2g/L로 변경해가며 실험을 진행하였다. 혼합영양배양방식의 대조군으로서, 독립영양배양방식의 플라스크를 사용하였으며 CO₂를 무기탄소원으로 사용하였다. 혼합영양배양방식과 독립영양배양방식의 경우 일반적인 실험실 단위의 배양에서 수행되는 것처럼 빛을 계속적으로 공급하였다.

[0059] 도 3a는 실시예 2에 따른 독립영양배양방식과 유기탄소원으로 아세트산을 사용한 경우(0.5g/L, 1g/L, 2g/L)의 혼합영양배양방식의 각 배양 방식별 건조 균체량 변화를, 도 3b는 실시예 2에 따른 독립영양배양방식과 유기탄소원으로 아세트산을 사용한 경우(0.5g/L, 1g/L, 2g/L)의 혼합영양배양방식의 각 배양 방식별 TCA 회로 내 중간 생성물의농도(단위: $n \text{ mol } (10^7 \text{ cells})^{-1}$)를 각각 나타낸다.

[0061] 제시된 모든 배양방식으로 얻은 바이오매스(도 3a)와, 성장이 가장 활발한 시점(60시간)에서 측정된 TCA 회로 중간 생성물 표와 도(도 3b, [표 1] 참조)을 통해 나타냈다. 일반적으로 공급하는 유기탄소원의 양이 많아질수록, 얻을 수 있는 바이오매스의 양이 증가하는 경향을 보인다. 하지만, 유기탄소원으로 아세트산을 사용했을 때는 일반적인 경향과는 큰 차이가 있었다. 가장 많은 탄소원(아세트산 2g/L)을 공급한 경우가 72 ~ 120시간 구간에서 가장 건조 균체량(DCW)이 적으며, 아세트산 1g/L를 유기탄소원으로 공급한 경우에는 72 ~ 120시간 구간에서 가장 건조 균체량(DCW)이 크며, 아세트산 2g/L를 유기탄소원으로 공급한 경우보다 12% 많은 건조 균체량을 보임을 확인하였다(도 3a 참조). 따라서 pH, 광량 등 다른 조건이 동일함에도 불구하고 아세트산의 초기농도와 세포 성장이 비례하지 않음을 알 수 있다.

[0062] 고농도 아세트산을 이용하였을 때, 세포 성장의 억제를 분석하기 위하여 UPLC 장비를 통하여 각 농도별 TCA 회로의 중간 생성물을 분석하였다. TCA 회로에서, 유기탄소원은 피루브산염(Pyruvate), 아세틸-CoA(Acetyl-CoA), 구연산염(Citrate), 숙신산염(Succinate), 푸마르산염(Fumarate), 말산염(Malate)의 순서대로 전환된다. 그런데 미세조류의 성장에서 유기탄소원으로 아세트산을 사용하였을 경우, 숙신산염의 과도한 생성은 세포 성장을 저해하는 것으로 알려져 있다. 아세트산 2g/L를 유기탄소원으로 공급한 경우, 독립영양배양방식과 보다 낮은 농도의 아세트산을 공급한 경우에 비해 숙신산염의 중간생성물의 양이 많음을 알 수 있다(도 3b 및 [표 1] 참조). 또한 고농도의 아세트산은 ATP를 억제하는 효과를 증가시키며, TCA 회로의 활성화를 저해함으로써 세포 성장을 방해하므로, 특정 농도 이상의 유기탄소원의 공급은 대량 배양을 위한 세포의 급속한 성장을 방해할 수 있다.

[0063] [표 1] 독립영양배양방식과 유기탄소원으로 아세트산을 썼을 때(0.5g/L, 1g/L, 2g/L)의 혼합영양배양방식의 각 배양 방식별 TCA 회로 내 중간생성물의 농도(단위 : $n \text{ mol } (10^7 \text{ cells})^{-1}$)

중간생성물 (단위 : $n \text{ mol } (10^7 \text{ cells})^{-1}$) 배양방식	Pyruvate	Acetyl-CoA	Citrate	Succinate	Fumarate	Malate
Autotrophy	0.2	0.25	0.46	1.68	0.17	1.15
Acetic Acid 0.5g/L	0.36	0.41	0.71	0.69	0.1	0.41
Acetic Acid 1g/L	0.7	0.9	1.52	1.56	0.1	0.68
Acetic Acid 2g/L	1.12	1.24	1.31	3.2	0.29	1.43

[0064]

[0066] 실시예 3. 유기탄소원인 포도당을 이용한 혼합영양배양 방식과 무기탄소원을 이용한 독립영양배양 방식의 바이오매스 및 TCA 회로 중간 생성물 비교

[0067] 실시예 3에서는 유기탄소원으로 포도당을 사용하였을 때, 유기탄소원의 공급에 따른 독립영양배양방식과 혼합영양배양방식의 바이오매스와 TCA 회로 내 중간 생성물을 비교하였다. 혼합영양배양방식과 독립영양배양방식 모두 광합성을 위하여 성장 기간 내에 지속적으로 빛을 공급하였다. 또한, 무기탄소원으로는 CO_2 를, 유기탄소원으로는 포도당(0.167g/L, 0.333g/L, 0.667g/L)을 공급하였다. 여기서 포도당 0.167g/L은 아세트산 0.5g/L과 같은 농도에서 같은 탄소량을 가지며, 포도당 0.333g/L, 0.667g/L은 각각 아세트산 1g/L, 2g/L와 같은 농도에서 같은 탄소량을 가진다.

[0068] 도 4a는 독립영양배양방식과 유기탄소원으로 포도당을 사용한 경우(0.5g/L, 1g/L, 2g/L)의 혼합영양배양방식의 각 배양 방식별 건조 균체량 변화, B)는 독립영양배양방식과 유기탄소원으로 포도당을 사용한 경우(0.5g/L, 1g/L, 2g/L)의 혼합영양배양방식의 각 배양 방식별 TCA 회로 내 중간생성물의 농도(단위 : $n \text{ mol } (10^7 \text{ cells})^{-1}$)를 나타낸다.

[0070] 유기탄소원으로 포도당을 사용한 경우, 낮은 농도에서 유기탄소원으로 아세트산을 사용한 경우와 비슷한 경향을 보였지만, 유기탄소원의 농도를 높일수록 서로 다른 경향을 나타냈다. 모든 배양방식으로 얻은 산출량은 도 4a에 나타났다. 4일간의 배양 후, 아세트산과 달리, 포도당을 유기탄소원으로 사용하는 경우에는 일반적인 경향과 마찬가지로 혼합영양배양방식에서의 성장량은 투입된 유기탄소원의 양이 많을수록 크게 나타났다. 그러나, 투입한 유기탄소원의 양과 바이오매스의 양이 정비례하게 늘어나지는 않았다.

[0071] 성장이가장 활발한 시점(60시간)에서 측정된 TCA 회로의 중간 생성물을 순서대로 나타내는 표와 도(도 4b, [표 2])을 통해 분석하였다. 포도당 0.667g/L를 공급하였을 때, 포도당 0.333g/L을 공급하였을 때에 비하여 상대적으로 높은 구연산염(Citrate) 농도는 세포의 성장을 더디게 한다. 또한, 과량의 아세틸-CoA(Acetyl-CoA)과 구연산염(Citrate) 포도당신생합성 (Gluconeogenesis)을 일으켜, 포도당의 포도당 분해과정(Glycolysis)을 억제하게 된다. 이 포도당 분해 과정의 억제는 세포 성장에 중요한 역할을 하는 피루브산염과 아세틸-CoA의 감소를 불러오므로, 투입된 유기탄소원의 양이 많으면 바이오매스의 생산수율이 떨어짐을 확인할 수 있었다.

[0072] [표 2] 독립영양배양방식과 유기탄소원으로 포도당을 썼을 때(0.167g/L, 0.333g/L, 0.667g/L)의 혼합영양배양방식의 각 배양 방식별 TCA 회로 내 중간생성물의 농도(단위 : n mol (10⁷ cells)⁻¹)

배양방식 \ 중간생성물 (단위 : n mol (10 ⁷ cells) ⁻¹)	Pyruvate	Acetyl-CoA	Citrate	Succinate	Fumarate	Malate
Autotrophy	0.2	0	0.46	1.68	0.17	1.15
Glucose 0.167g/L	0.38	0.42	1.25	1.32	0.18	0.61
Glucose 0.333g/L	0.8	0.81	2.25	2.23	0.28	1.2
Glucose 0.667g/L	1.42	2.41	4.89	4.31	0.61	2.37

[0073]

[0075] 실시예 4. 아세트산, 포도당을 이용한 순차적 반복 독립-종속영양 방식

[0076] 실시예 2와 실시예 3의 결과를 통해 적절한 양의 유기탄소원의 공급을 통하여 유기탄소원 소모 대비 높은 세포 성장을 이루어 낼 수 있다. 긴 시간의 빛 노출은 광합성 수용체 시스템에 손상을 가할 수 있고, 이로 인해 광합성이 저해될 수 있다.

[0077] 도 5a는 실시예 4에 따른 클로렐라 프로토테코이드의 광주기/암주기(24시간/0시간, 16시간/8시간, 14시간/10시간, 12시간/12시간)별 건조 중량을, 도 5b는 실시예 4에 따른 순차적 반복 독립-종속영양배양방식에서 유기탄소원으로 아세트산을 사용한 경우(0.5g/L, 1g/L, 2g/L)의 건조 균체량 변화를, 도 5c는 실시예 4에 따른 순차적 반복 독립-종속영양배양방식에서 유기탄소원으로 포도당을 사용한 경우(0.167g/L, 0.333g/L, 0.667g/L)의 건조 균체량 변화를 각각 나타낸다(도면 하단에 표시된 구간은 0~16, 24~40, 48~64, 72~88, 96~112시간의 광주기 및 16~24, 40~48, 64~72, 88~96, 112~120시간의 암주기임).

[0079] 클로렐라 프로토테코이드의 경우에는 광주기/암주기가 16시간/8시간일 경우에 가장 우수한 성장성을 가진다(도 5a 참조). 또한, 기존의 혼합영양방식의 단점은 기질의 높은 농도가 광합성을 저해하고, 이로 인해 미세조류의 생산성과 탄소 고정 효율이 떨어진다는 점이다. 따라서, 탄소 고정 효율 감소와 광합성 저해를 막기 위해 광주기에서는 독립영양배양방식, 암주기에서는 저농도의 유기탄소원 공급을 통한 종속영양배양방식을 이용하는 순차적 반복 독립-종속영양 방식을 제안하였다. 이러한 방식을 이용하여, 혼합영양배양방식의 단점을 극복하고, 고농도 이산화탄소를 이용한 대규모 배양에서 유기탄소원을 추가적으로 이용하여 바이오매스 생산성을 향상시키고 동시에 세포배양의 주기를 단축시킬 수 있다.

[0080] 순차적 반복 독립-종속영양 방식에서 유기탄소원으로 아세트산(0.5g/L, 1g/L, 2g/L)과 포도당(0.167g/L, 0.333g/L, 0.667g/L)을 사용하여 실험하고, 그 결과를 도 5b 및 도 5c에서 비교하였다. 광주기/암주기를 16시간/8시간으로 설정하여, 광주기에 해당하는 0 ~ 16, 24 ~ 40, 48 ~ 64, 72 ~ 88, 96 ~ 112시간에는 빛과 5% CO₂를 공급하였고, 암주기에 해당하는 16 ~ 24, 40 ~ 48, 64 ~ 72, 88 ~ 96, 112 ~ 120시간에는 각 암주기마다 일정한 농도의 유기탄소원을 기질로서 공급하였다. 또한, 대조군으로는 계속적으로 빛과 5% CO₂를 공급하는 독립영양방식을 이용하였다.

[0082] 아세트산을 기질로 사용하였을 경우, 암주기에서 1g/L의 아세트산을 지속적으로 공급하는 경우에 가장 성장성이 우수하였으며, 대조군과 비교하여 96시간 기준 바이오매스가 27.2% 향상하였음을 확인하였다(96시간 이후에는 질소원 고갈로 인해 추가적인 바이오매스 생장이 일어나지 않았음). 암주기에서 2g/L의 아세트산을 지속적으로 공급하는 경우에는 숙신산염의 형성으로 인하여 세포 성장이 억제되어 1g/L의 아세트산을 지속적으로 공급하는

경우보다 바이오매스 성장이 더디게 이루어졌다(도 5b 참조).

- [0083] 포도당을 기질로 사용하였을 경우, 기질을 가장 많이 공급한, 암주기에서 0.667g/L의 포도당을 지속적으로 공급하는 경우가 바이오매스 성장성이 우수하였으며, 대조군과 비교하여 88시간 기준 바이오매스가 58.1% 더 증가하였음을 확인하였다(88시간 이후에는 질소원 고갈로 인해 추가적인 바이오매스 생장이 일어나지 않음)(도 5c 참조).
- [0084] 따라서 순차적 반복 독립-종속영양 방식이 기존에 이루어지던 독립영양방식에 비해 우수한 배양방식임을 확인할 수 있다.
- [0086] 실시예 5. 아세트산과 포도당을 유기탄소원으로 이용 시 바이오매스 전환을 극대화하기 위한 순차적 반복 독립-종속영양 방식
- [0087] 미세조류의 순차적 반복 독립-종속영양방식에서 같은 양의 기질을 투입하였을 경우, 배양 시간이 진행될수록 미세조류 세포 당 기질의 양은 감소하게 되고, 세포의 성장속도가 감소하게 된다. 따라서, 세포의 성장 속도를 지속시키기 위해, 암주기에서 넣어주는 기질의 양을 미세조류 세포의 양에 비례하여 증가시키고자 한다. 대조군으로, 5% CO₂를 공급해주면서 광주기를 24시간 동안 지속시키는 독립영양방식을 이용하였다. 아세트산을 유기탄소원으로 사용하였을 경우, 순차적 반복 독립-종속영양 방식에서는 암주기인 16 ~ 24, 40 ~ 48, 64 ~ 72, 88 ~ 96 시간에서 각각 0.5g/L, 1g/L, 1.5g/L, 1.75g/L를 투입하였고, 혼합영양배양 방식에서는 기질의 양을 같게 하도록 4.75g/L을 투입하여 건조중량을 측정했다. 마찬가지로 포도당을 유기탄소원으로 사용하였을 경우, 순차적 반복 독립-종속영양 방식에서는 암주기인 16 ~ 24, 40 ~ 48, 64 ~ 72, 88 ~ 96시간에서 각각 0.167g/L, 0.333g/L, 0.5g/L, 0.583g/L을 투입하였고, 혼합영양배양방식에서는 포도당을 1.583g/L을 넣어 투여한 기질의 양을 같게 한 후에 건조중량을 측정하였다.
- [0088] 도 6a는 실시예 5에 따른 유기탄소원으로 아세트산을 사용한 경우의 독립영양방식(Autotrophy), 혼합영양방식(Mixotrophy), 순차적 반복 독립-종속영양배양방식(Repeated sequential auto-and heterotrophy)에서의 건조균체량 변화, 도 6b는 실시예 5에 따른 유기탄소원으로 포도당을 사용한 경우의 독립영양방식(Autotrophy), 혼합영양방식(Mixotrophy), 순차적 반복 독립-종속영양배양방식(Repeated sequential auto-and heterotrophy)에서의 건조균체량 변화(도면 하단에 표시된 구간은 0~16, 24~40, 48~64, 72~88, 96~112시간의 광주기 및 16~24, 40~48, 64~72, 88~96, 112~120시간의 암주기)를 각각 나타낸다. 도 6c는 실시예 5에 따른 유기탄소원으로 아세트산을 사용한 경우의 혼합영양방식(Mixotrophy), 순차적 반복 독립-종속영양배양방식(Repeated sequential auto-and heterotrophy)에서의 유기탄소원 소모량 대비 비생장속도의 값을, 도 6d는 실시예 5에 따른 유기탄소원으로 포도당을 사용한 경우의 혼합영양방식(Mixotrophy), 순차적 반복 독립-종속영양배양방식(Repeated sequential auto-and heterotrophy)에서의 유기탄소원 소모량 대비 비생장속도의 값을 각각 나타낸다. 도 6e는 실시예 5에 따른 유기탄소원으로 아세트산을 사용한 경우의 독립영양방식(Autotrophy), 혼합영양방식(Mixotrophy), 순차적 반복 독립-종속영양배양방식(Repeated sequential auto-and heterotrophy)에서의 ATP/ADP 비를, 도 6f는 실시예 5에 따른 유기탄소원으로 포도당을 사용한 경우의 독립영양방식(Autotrophy), 혼합영양방식(Mixotrophy), 순차적 반복 독립-종속영양배양방식(Repeated sequential auto-and heterotrophy)에서의 ATP/ADP 비를 각각 나타낸다.
- [0089] 위와 같은 배양 방식을 사용했을 경우, 아세트산을 기질로 사용한 경우, 96시간에서 순차적 반복 독립-종속영양방식의 세포 성장은 각각 혼합영양배양방식에 비해 32.3%, 독립영양배양방식에 비해 50.2% 높다(도 6a 참조). 반복 독립-종속영양 방식은 유기탄소원을 미세조류 세포의 양에 비례하여 투입하였기 때문에, 기질 소모량 대비 수율($Y_{X/A}$)이 40 ~ 96시간에서 비슷하게 유지되며, 혼합영양배양방식에 비해 2.59배 이상 높게 유지된다(도 6c 참조). 또한, TCA 회로의 활성화 지표인 ATP/ADP 비율 또한 반복 독립-종속영양 방식에 비해 2.17배 이상 높게 유지됨을 확인하였다(도 6e 참조).
- [0090] 포도당을 기질로 사용한 경우에도 마찬가지로, 96시간 구간에서 순차적 반복 독립-종속영양 방식의 세포 성장은 각각 혼합영양배양방식에 비해 12.6%, 독립영양배양방식에 비해 50.1% 높다(도 6b 참조). 유기탄소원을 미세조류 세포의 양에 비례하여 투입하는 방식은 TCA 회로의 활성화를 높은 상태로 유지시켜서 보다 높은 기질 소모량 대비 수율($Y_{X/A}$)을 보여준다(도 6d 및 도 6f 참조).
- [0091] 또한, 탄소 집중 메커니즘(CCM)의 지표인 탄산무수화효소 비활성도(Carbonic anhydrase specific activity)와

루비스코 효소 비활성도(Rubisco specific activity) 또한 반복 독립-종속영양 방식의 경우 혼합영양방식에 비해 각각 84.8%, 149% 높음을 확인하였다. 뿐만 아니라, 아래 [표 3]과 같이 생산성을 통해 구한 최대 탄소 고정 비율 또한 높은 생산성 덕분에 독립영양방식에 비해 42.3% 높은 것을 확인하였다.

[0093] [표 3] 아세트산을 기질로 사용한 경우의 배양 방식별 건체 중량, 비성장속도, 탄산무수화효소 비활성도, 루비스코 효소 비활성도, 최대 탄소 고정 비율(최대 탄소 고정 비율, $P_{CO2}=P_{max} \times 1.88$. 순차적 반복 독립-종속영양방식은 종속영양방식으로 인한 생산성을 제외한 나머지 생산성값에 1.88배를 곱함)

배양방식 측정 지표	독립영양방식	종속영양방식	혼합영양방식	순차적 반복 독립-종속영양방식
생산성 (P_{max} , g/L/day)	0.4027	0.5518	0.7369	1.1247
탄산무수화효소 비활성도(U/g)	1.567	0.6405	0.7155	1.323
루비스코 효소 비활성도(U/g)	7.094	1.980	2.430	6.045
최대 탄소 고정 비율(P_{CO2} , Maximum carbon fixation rate: g/L/day)	0.7571	-	-	1.077

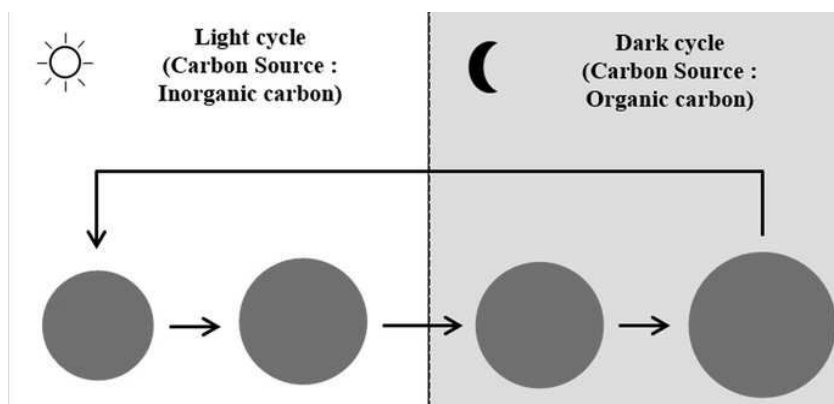
[0096] 따라서, 순차적 반복 독립-종속영양 방식 배양 방식은 광합성 효율의 저하를 피하면서도, TCA 회로의 활성화를 촉진하여 세포 성장에 기여함을 알 수 있다. 게다가, 광합성 효율의 보존은 탄소 고정(Carbon fixation)에 큰 영향을 미치므로, CCU 관점에서도 의미 있는 배양 방식이라고 할 수 있다.

[0098] 이상으로 본 발명을 구체적인 실시예를 통하여 상세히 설명하였으나, 이는 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명은 이에 한정되지 않으며, 본 발명의 기술적 사상 내에서 당 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의해 그 변형이나 개량이 가능함이 명백하다.

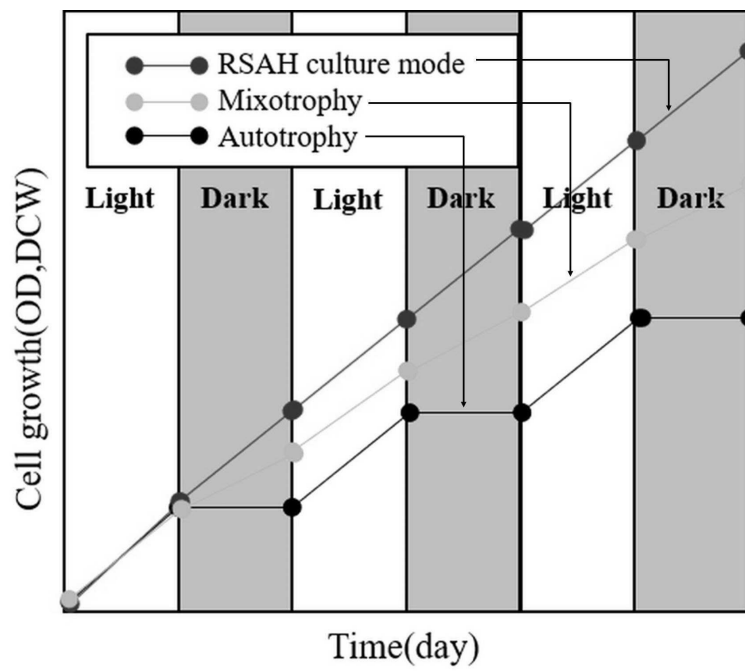
[0099] 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 모두 본 발명의 영역에 속한 것으로 본 발명의 구체적인 보호 범위는 첨부된 특허청구범위에 의하여 명확해질 것이다.

도면

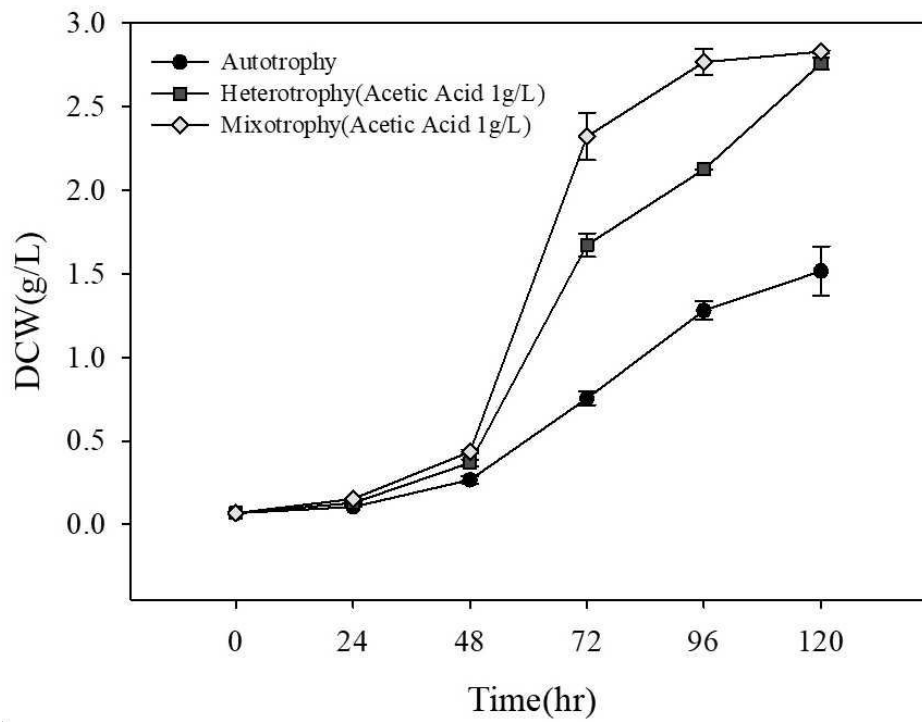
도면1a



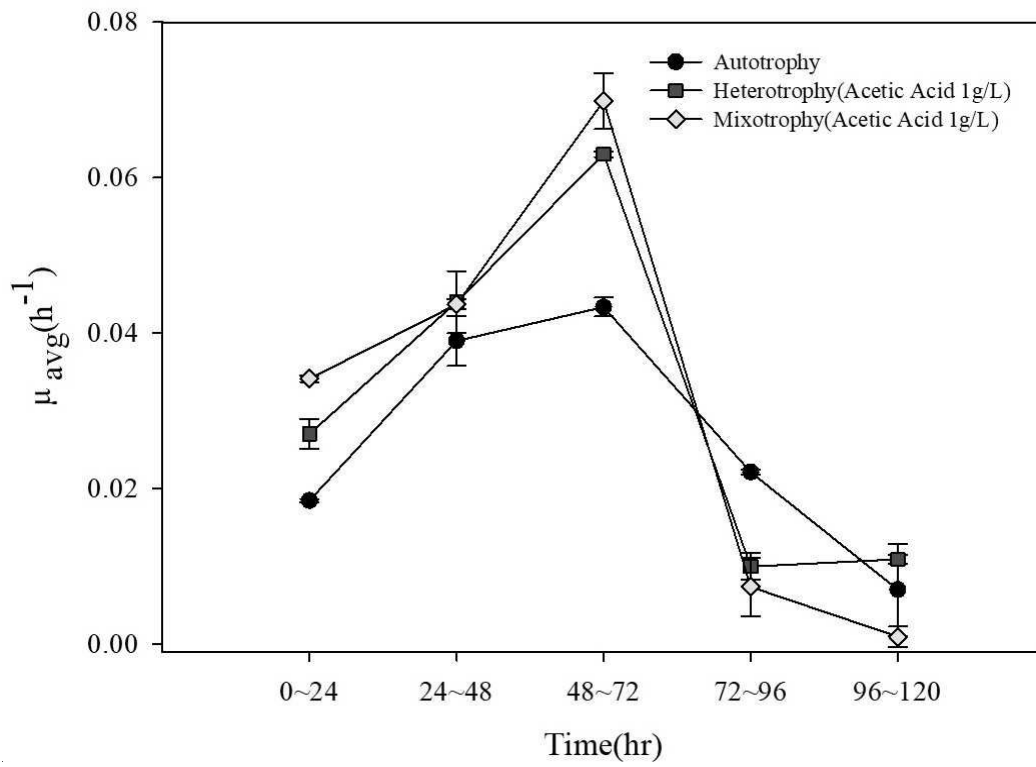
도면1b



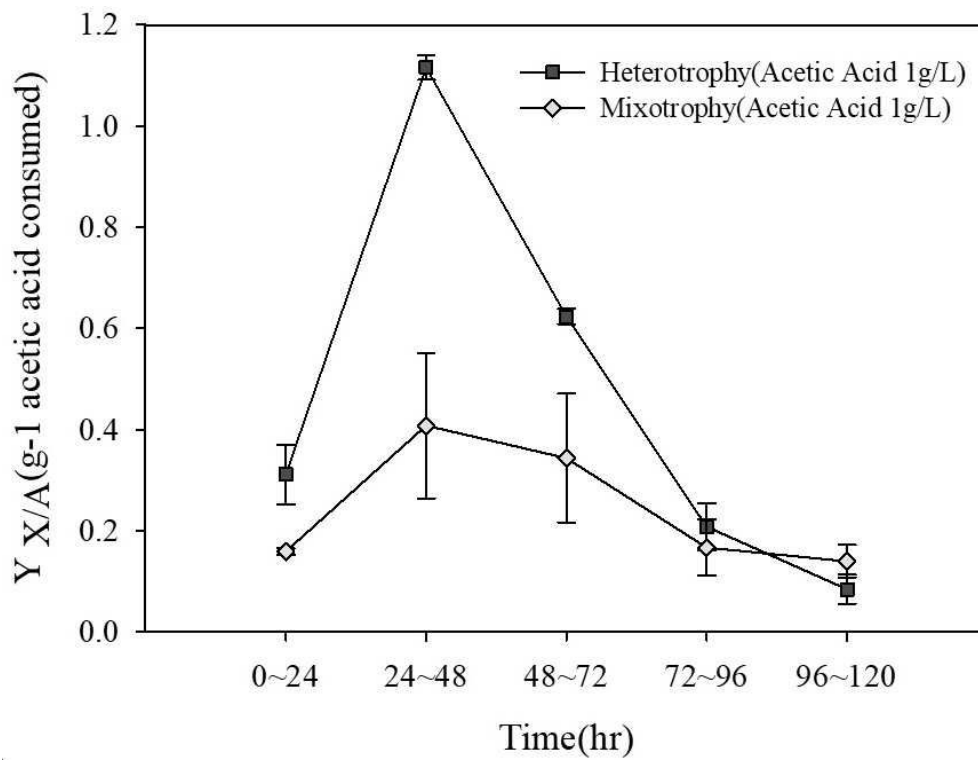
도면2a



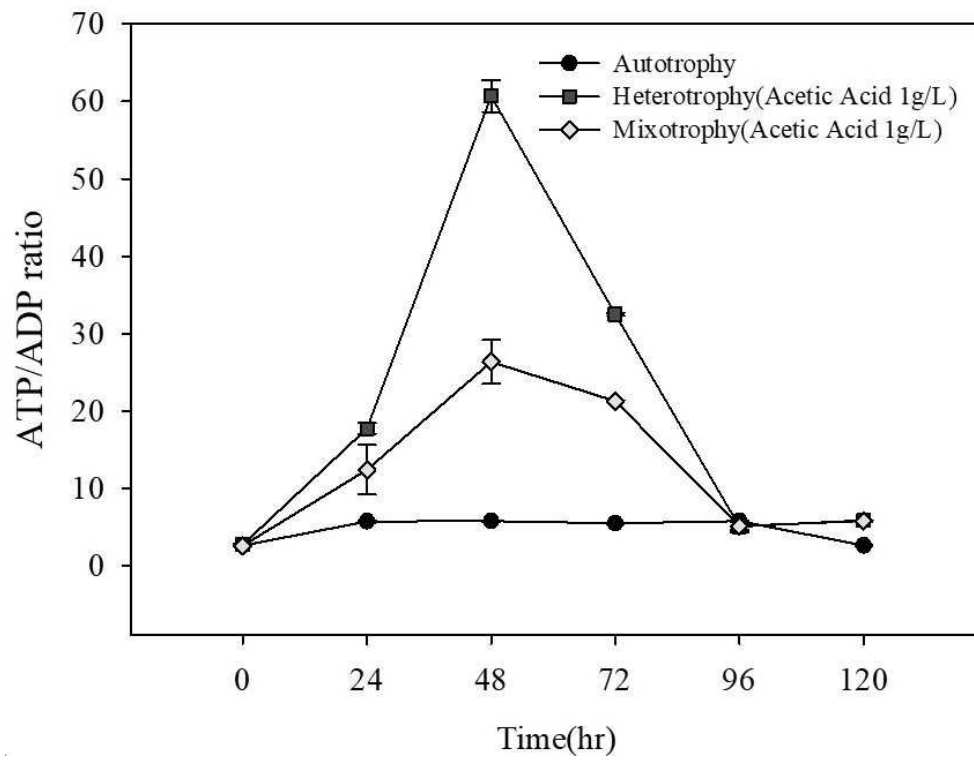
도면2b



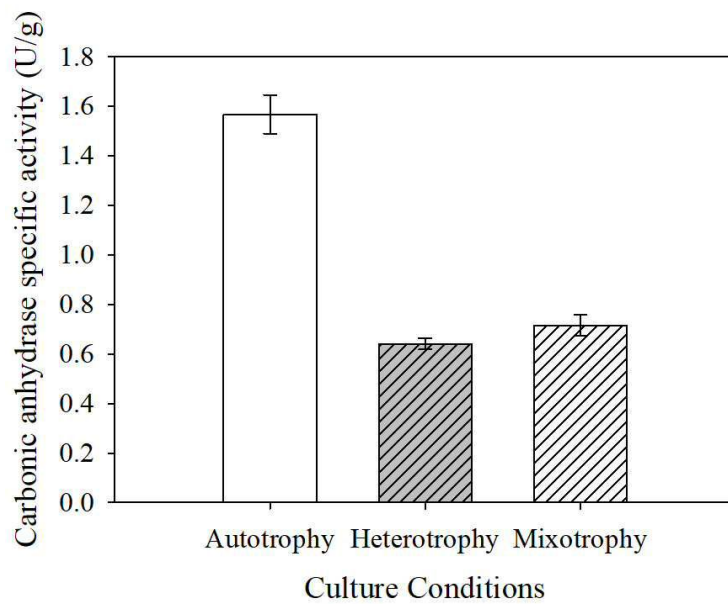
도면2c



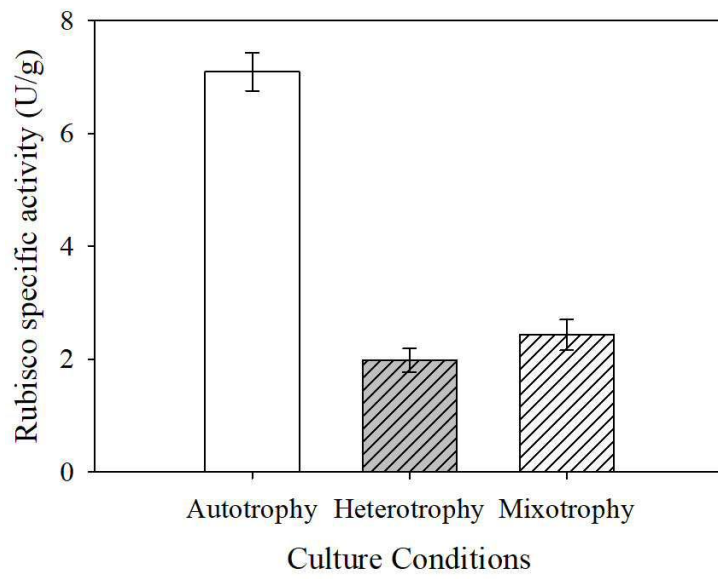
도면2d



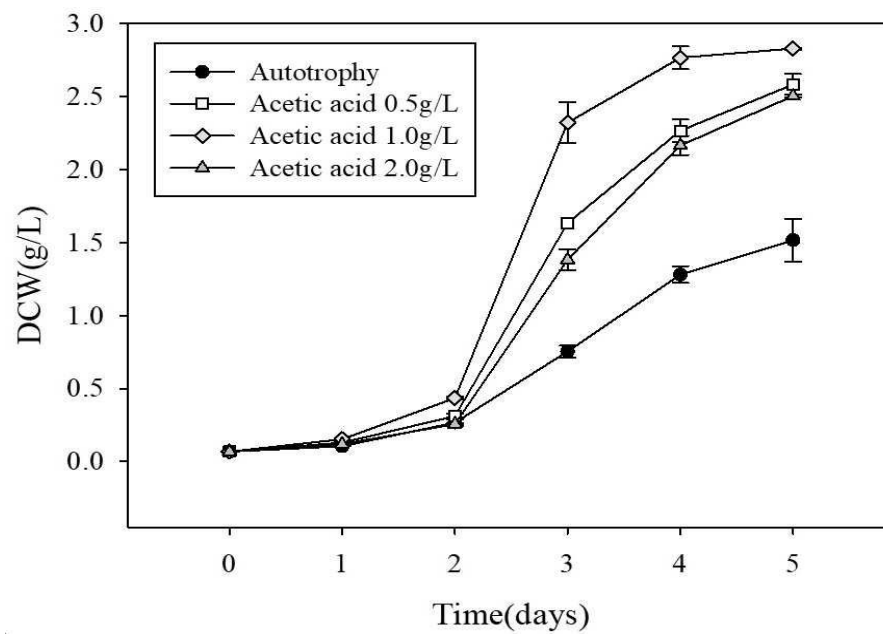
도면2e



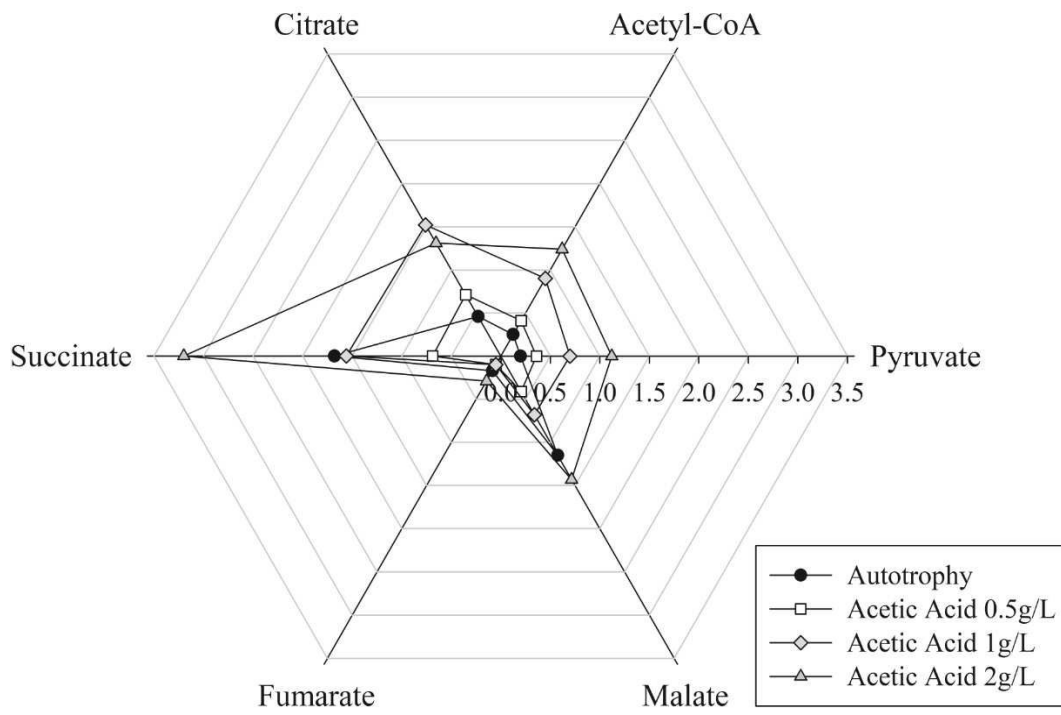
도면2f



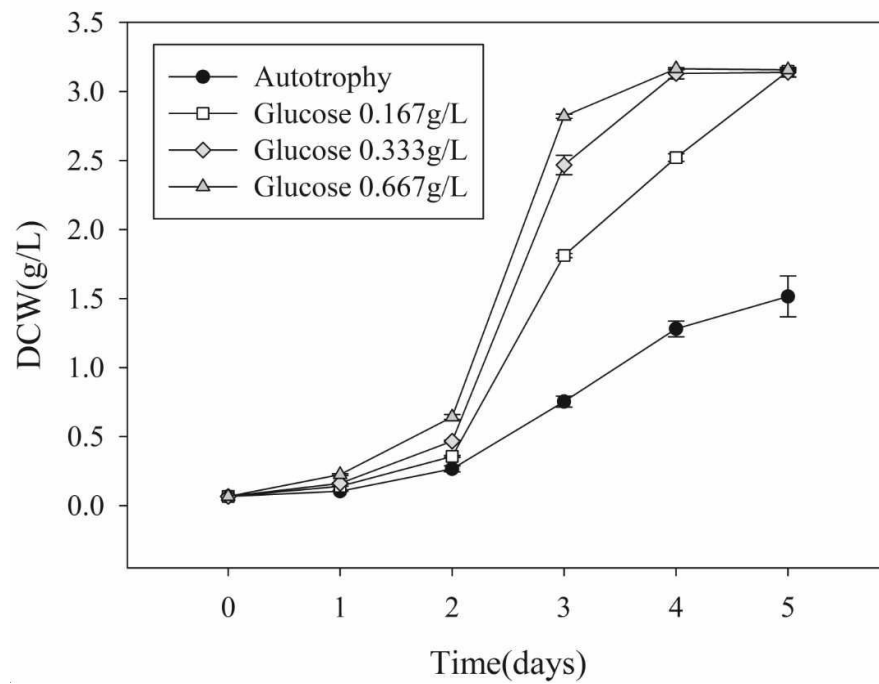
도면3a



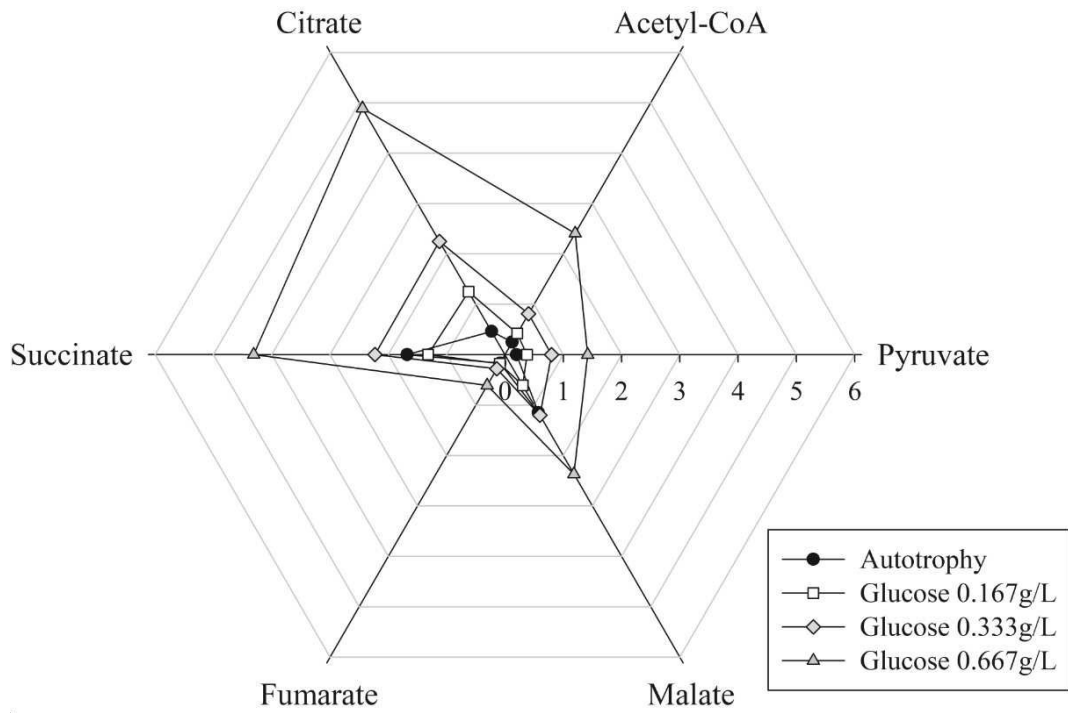
도면3b



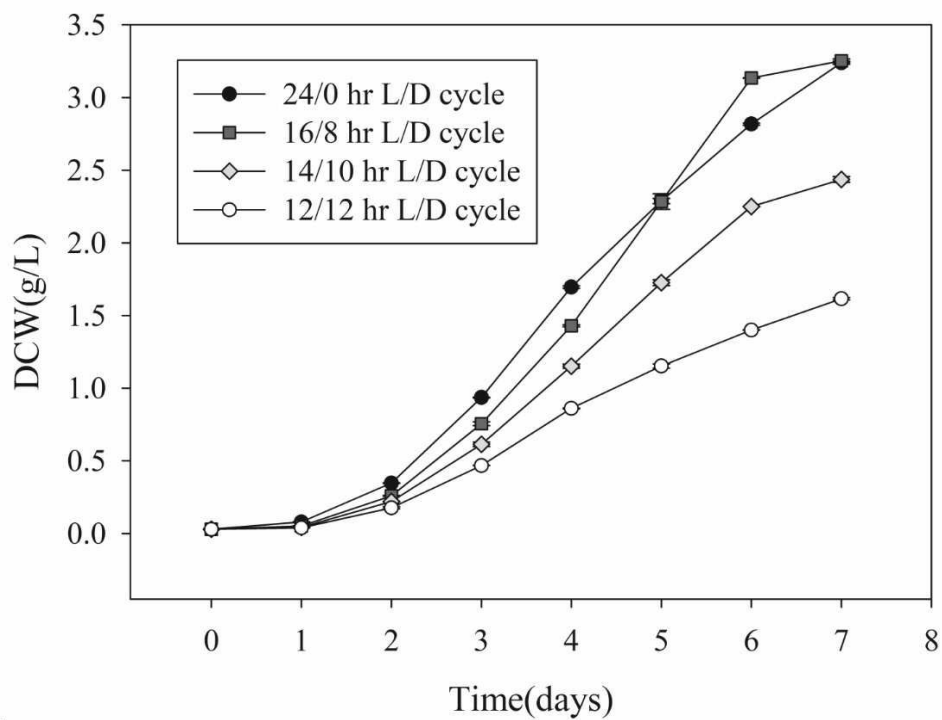
도면4a



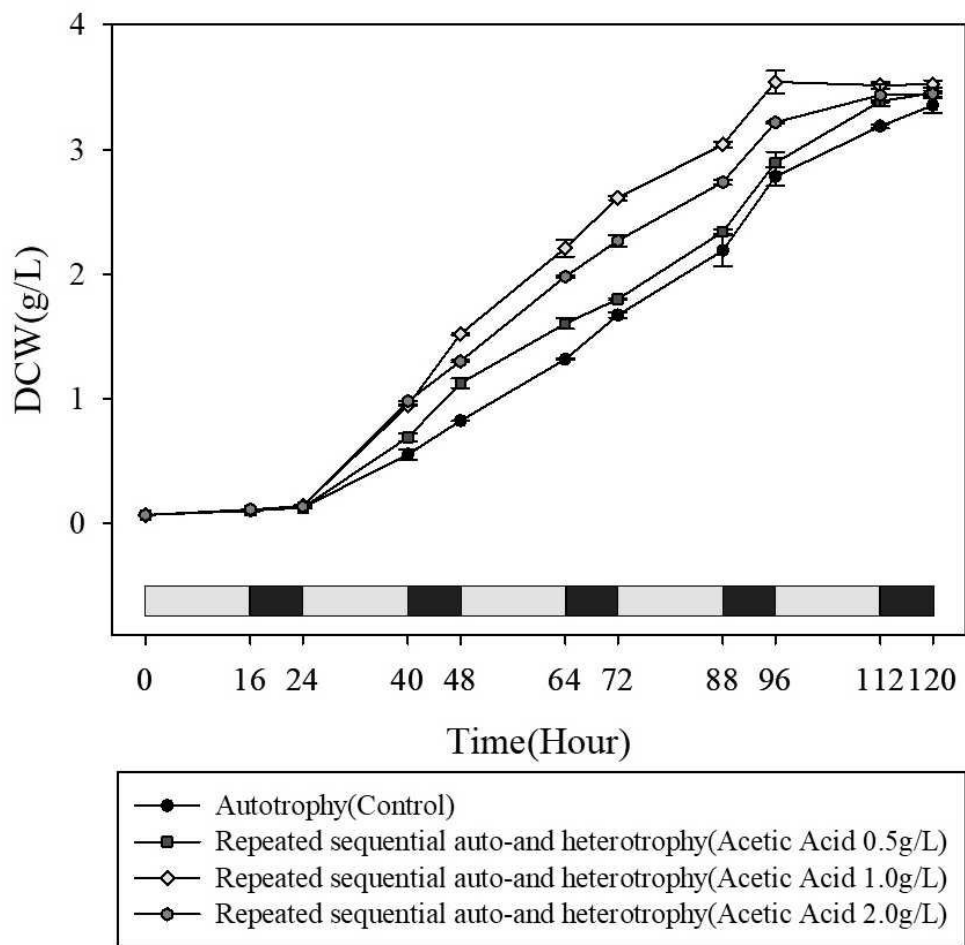
도면4b



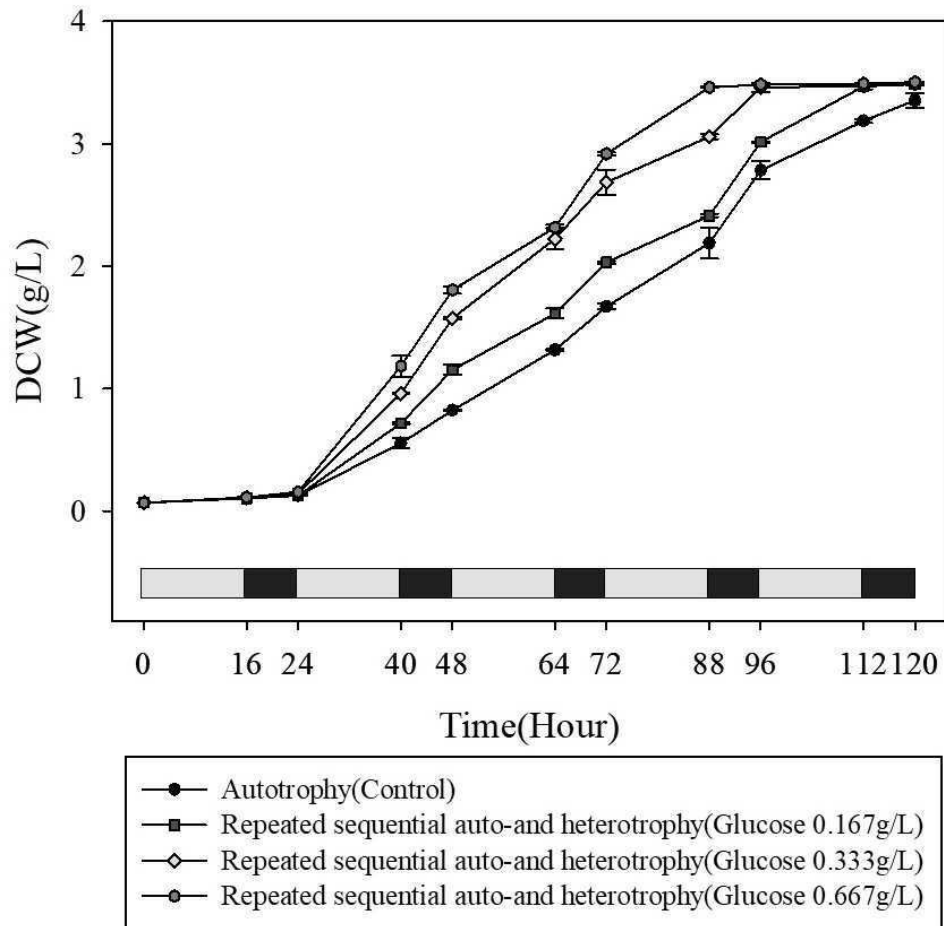
도면5a



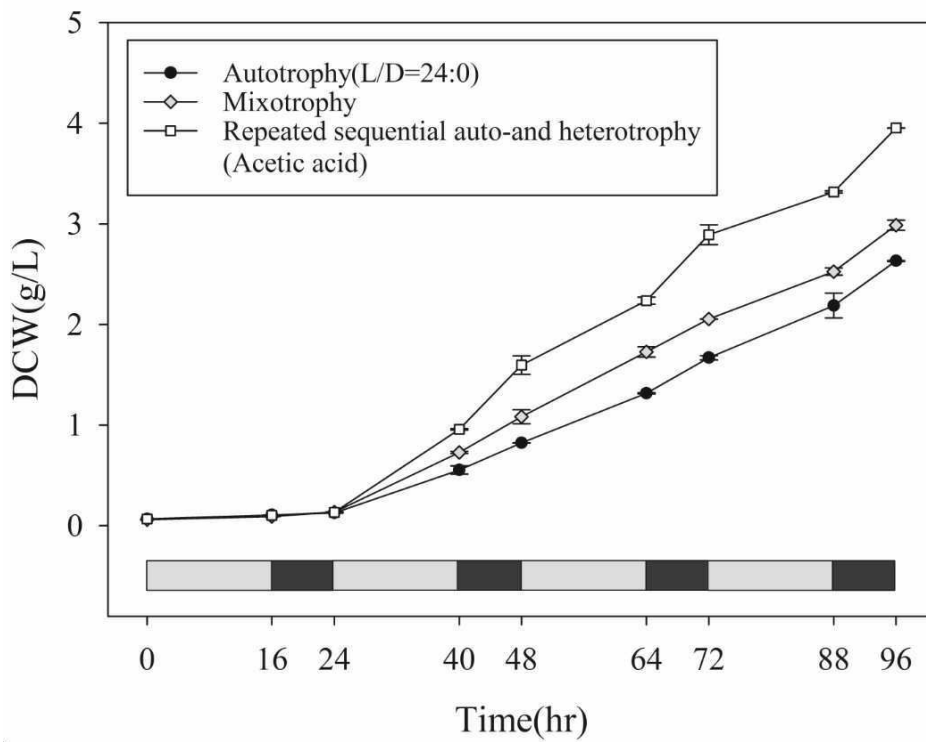
도면5b



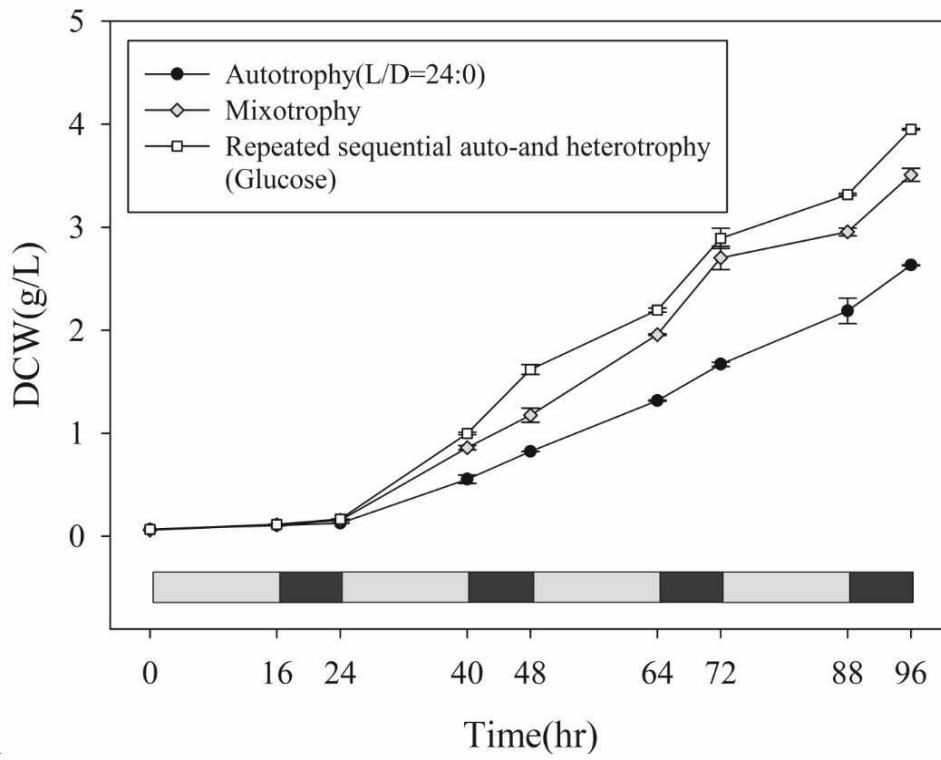
도면5c



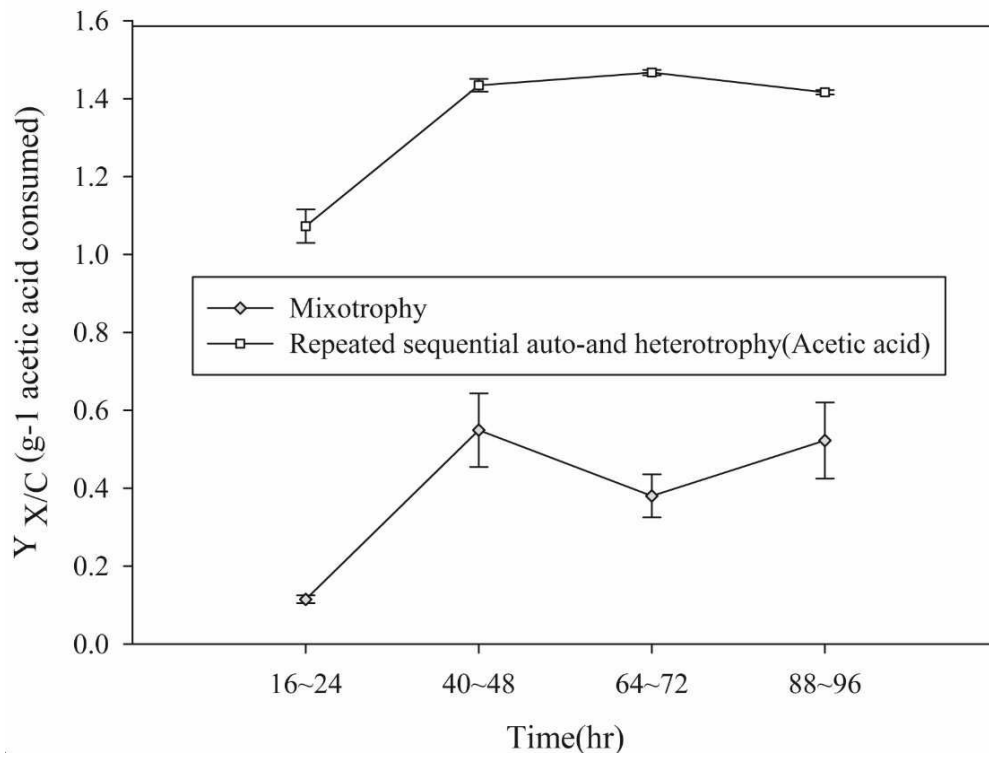
도면6a



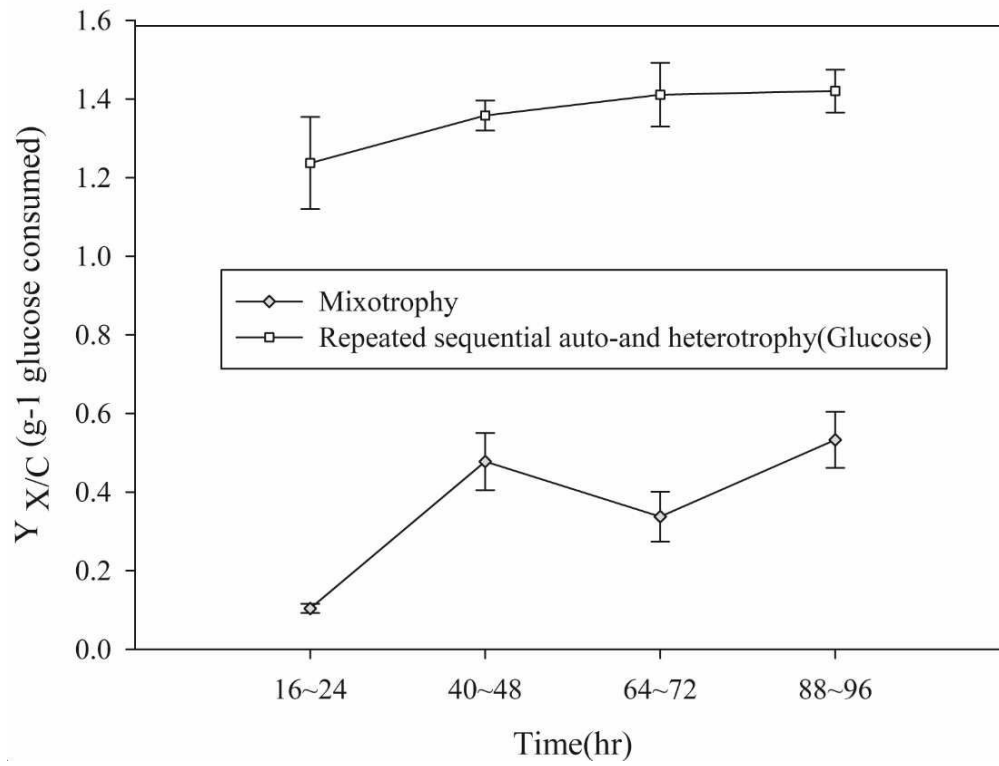
도면6b



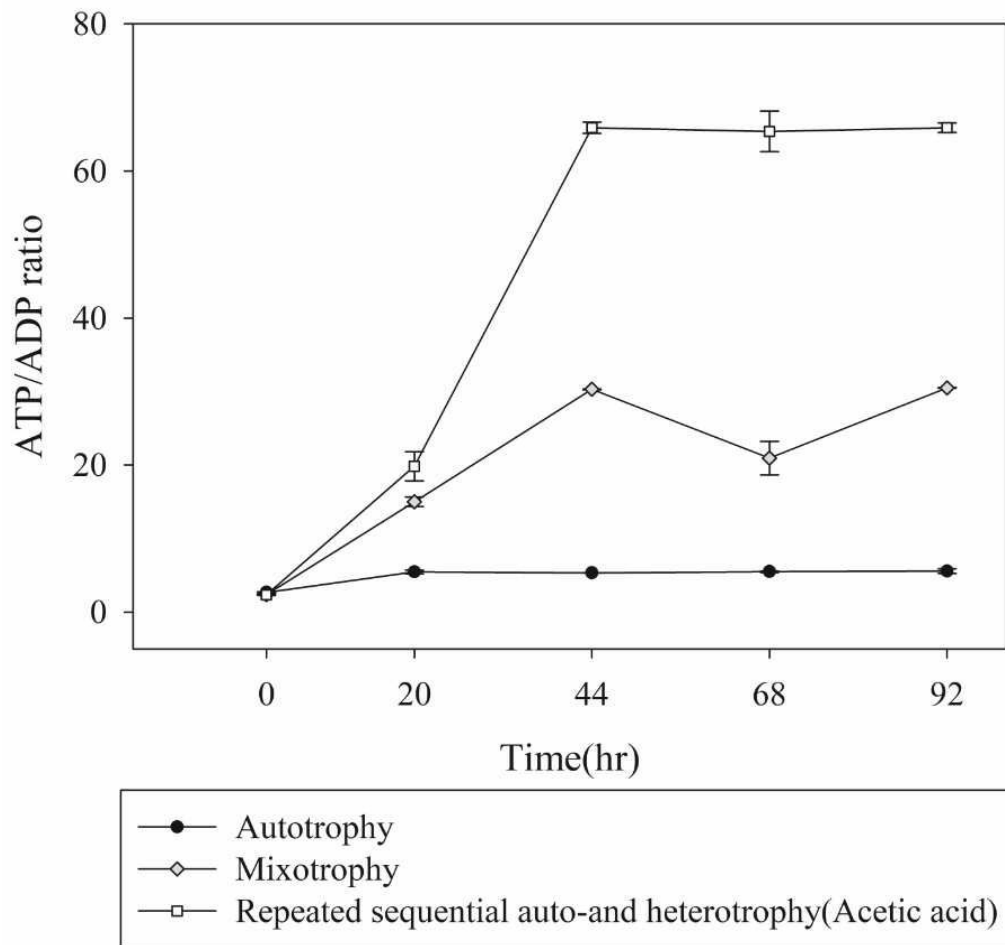
도면6c



도면6d



도면6e



도면6f

